温度通过影响 *Wolbachia* 滴度调控赤眼蜂生殖方式

陈 茜[1,2], 王丽艳[1,2,*], 杨志强[1,2], 赵长江[1,2], 贺 琳[1,2], 张海燕[1,2,*]

(1. 黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江大庆 163319; 2. 黑龙江省教育厅寒地作物种质改良与栽培重点实验室, 黑龙江大庆 163319)

摘要:【目的】揭示温度对宿主体内 *Wolbachia* 滴度及其调控宿主生殖作用的影响。【方法】以感染 *Wolbachia* 且营孤雌产雌生殖的食胚赤眼蜂 *Trichogramma embryophagum* 为对象,在 22, 25, 28 和 31℃ 4 个梯度温度下连续培养 5 代,观察生殖方式、性比等生物学特性;采用实时荧光定量 PCR 以 *Wolbachia* 特异基因——外膜蛋白基因(*wsp*)、二磷酸果糖醛缩酶基因(*fbpA*)和酰胺转移酶基因(*gatB*)为靶标对内生菌进行定量分析。【结果】22 和 25℃条件下连续培养 5 代,食胚赤眼蜂生殖方式均未发生改变(无雄蜂出现),且 5 代赤眼蜂群体 *Wolbachia* 滴度没有明显差异;28℃下,食胚赤眼蜂在 F_3 代开始有雄蜂出现,至 F_5 代雄蜂比例明显增多,且体内 *Wolbachia* 滴度在 F_2 代开始下降,至 F_5 代显著下降;31℃下,F_2 代即有雄蜂出现,至 F_5 代已经恢复成产雄孤雌生殖,体内 *Wolbachia* 滴度也在 F_2 代开始下降,F_3 代开始显著降低,到 F_5 代 *Wolbachia* 滴度极小甚至检测不到。【结论】高温可改变营孤雌产雌生殖赤眼蜂的生殖方式及体内 *Wolbachia* 滴度,且随着处理代数的增加以及温度的升高作用显著,即高温对营孤雌产雌生殖赤眼蜂生殖方式改变程度与其体内 *Wolbachia* 滴度呈负相关。

关键词: 沃尔巴克氏体; 食胚赤眼蜂; 温度; 滴度; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2016)04-464-08

Temperature regulates the reproduction mode of *Trichogramma embryophagum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) by influencing the titer of endosymbiont *Wolbachia*

CHEN Xi[1,2], WANG Li-Yan[1,2,*], YANG Zhi-Qiang[1,2], ZHAO Chang-Jiang[1,2], HE Lin[1,2], ZHANG Hai-Yan[1,2,*] (1. College of Agronomy, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China; 2. Key Laboratory of Crop Germplasm Improvement and Cultivation in Cold Regions of Heilongjiang Province Education Department, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract:【Aim】To reveal the effect of temperature on *Wolbachia* titer and its function in regulating the biological characteristics of host, the relationship between the biological indices of host and *Wolbachia* titer at different temperatures was evaluated in this study.【Methods】*Trichogramma embryophagum* wasps infected by parthenogenesis-inducing *Wolbachia* were cultivated under four temperature gradients (22, 25, 28 and 31℃) for five consecutive generations, and the biological characteristics including the reproductive mode and sex ratio were observed. At the same time, the *Wolbachia* titer was detected by fluorescence quantitative real-time PCR, using the specific primers of the outer surface protein gene (*wsp*), fructose bisphosphate aldolase gene (*fbpA*) and glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31301714); 高等学校博士学科点专项科研基金(20132305120001); 黑龙江省自然科学基金面上项目(C2015039); 黑龙江八一农垦大学研究生创新项目(YJSCX2014)

作者简介: 陈茜, 女, 1991 年 5 月生,黑龙江大庆人, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: cxnevergiveup@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: byndwly@126.com; zhanghy51@126.com

收稿日期 Received: 2015-12-14; 接受日期 Accepted: 2016-03-22

gene (*gatB*) in *Wolbachia*. 【Results】At 22 and 25℃, the reproduction mode of the total five generations of *T. embryophagum* was not altered, without drones appearing in culture population, and the *Wolbachia* titer also was not significantly different among five generations. At 28℃, a few of drones were found in F_3 generation and the majority of drones appeared in F_5 generation significantly, while the *Wolbachia* titer in *T. embryophagum* began to decline in F_2 generation and decreased significantly till F_5 generation. At 31℃, in F_2 generation the drones appeared, and in F_5 generation all *T. embryophagum* had restored to the androgenetic parthenogenetic; the *Wolbachia* titer began to decrease in the F_2 generation, decreased significantly in F_3 generation and was not detectable by PCR in F_5 generation. 【Conclusion】The reproduction mode and *Wolbachia* titer in parthenogenetic thelytokous *Trichogramma* can be altered by high temperature, and are affected significantly with the increase of temperature and generation. In other words, the alteration degree of reproductive mode of *Trichogramma* due to high temperature is negatively correlated with the endoymbiont *Wolbachia* titer.

Key words: *Wolbachia*; *Trichogramma embryophagum*; temperature; titer; fluorescence quantitative real-time PCR

沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 是一类广泛分布于节肢动物体内的共生细菌。在与宿主的长期进化过程中，*Wolbachia* 可以通过多种方式影响宿主的生殖方式，如细胞质不亲和(cytoplasmic incompatibility, CI)(Zabalou *et al*., 2004)、孤雌生殖(parthenogenesis inducing, PI)(Stouthamer *et al*., 1990)、雄性的雌性化(feminizing)(Rousset *et al*., 1992)、雄性致死(male-killing)(Jiggins *et al*., 2000)及增强雌性繁殖力和雄性生育力(fecundity and fertility-modifying)(Fleury *et al*., 1995)等。在宿主体内该菌主要是通过母系遗传的方式垂直传播(Rousset *et al*., 1992; Fleury *et al*., 2000)，在种内、种间也存在一定程度的水平传播(Huigens *et al*., 2000)。

Wolbachia 与 40 多个膜翅目物种的孤雌生殖有关(丛斌等, 1998; Weeks *et al*., 2001)。研究发现，孤雌生殖个体中 *Wolbachia* 的表达受母体孵育温度的影响，高温条件下产生的雄性个体增多(Stouthamer *et al*., 1990; 张海燕等, 2006)，某些含 PI *Wolbachia* 的雌性个体养育在 28℃下，会产生一些间性个体(Schilthuizen and Stouthamer, 1997)。已知多数因 *Wolbachia* 感染引起的 CI 等生殖方式改变的外显性都与细菌的滴度有关，即 *Wolbachia* 含量与宿主生殖方式和强度正相关(Kondo *et al*., 2005; Jaenike and Dyer, 2008; Cordaux *et al*., 2011)，但是关于 PI *Wolbachia* 的滴度与温度方面的研究鲜有报道。

本试验分析不同温度处理下，食胚赤眼蜂 *Trichogramma embryophagum* (Hartig)母代与继代培养种群 5 代的生殖方式、性比等生物学特性，通过实时定量 PCR(quantitative real-time PCR)方法分析了各代种群体内内共生菌 *Wolbachia* 的滴度变化情况，探讨食胚赤眼蜂生物学特性与其体内 PI *Wolbachia* 滴度间的关系，为进一步揭示环境温度依赖的 *Wolbachia* 对昆虫宿主生殖调控的机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

食胚赤眼蜂 *T. embryophagum* 由广东省农业科学院植物保护研究所李敦松研究员惠赠。在黑龙江八一农垦大学农学院养虫室用米蛾 *Corcyra cephalonica* (Stainton)卵保种繁殖 30 代以上，培养条件为 25±1℃，RH 为 65%±5%，光周期 16L∶8D。

1.2　赤眼蜂的处理

挑取被赤眼蜂寄生的米蛾卵，置于指形玻璃管内，每管 1 粒卵，用棉花塞住管口。4 个温度处理，每个处理 3 组，每 15 管为一组。分别置于 22, 25, 28 和 31℃的人工气候箱(SANYO, 日本)中恒温培养(25℃为对照组)，设定相对湿度 RH 均为 75%，光照为 16L∶8D。

取上述 4 个温度处理下同期羽化的食胚赤眼蜂各 30 头，分别置于指形玻璃管内进行编号，每管 1 蜂，加入少量 25% 蜂蜜水(天然蜂蜜与无菌水按体积比 1∶3 的比例混合)，并提供 200 粒左右新鲜米蛾卵的卵卡(由新鲜米蛾卵用天然桃胶均匀粘于滤纸上制成，在紫外灯下照射 10 min 杀胚)供其产卵寄生 36 h，之后分别放在 4 个温度下培养，至卵粒变黑

后，挑取单粒卵至新的指形玻璃管中，待出蜂后（F_0代）随机选取 30 头雌蜂，重复上述操作，连续处理 5 代，统计每代的寄生率（寄主米蛾卵变黑记为寄生）、羽化率和性比。

1.3 基因组 DNA 的提取

CTAB 法提取赤眼蜂基因组 DNA（李正西和沈佐锐，2001；柳晓丽等，2011）。取上述不同温度培养下各代羽化 24 h 后的雌蜂各 50 头，液氮速冻，分别置于含有 100 μL 裂解液[2% CTAB, 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA, 1.42 mol/L NaCl]的 1.5 mL 离心管中，－20℃冷冻 10 min，利用组织研磨器（Retsch，德国）进行匀浆；加入 2.5 μL 蛋白酶 K（20 mg/mL），65℃水浴 3 h，每 20 min 震荡摇匀一次；加入 100 μL 氯仿：异戊醇（24∶1，v/v），轻摇混匀，用微量高速冷冻离心机（HERLME，德国）12 000 r/min 离心 10 min；取上清液（约 100 μL），加入 2 倍体积无水乙醇，－20℃放置 3 h，13 000 r/min 离心 15 min；弃上清液，超净工作台（BIO-RAD，美国）风干 5～10 min，加入 30 μL 1 × TE 缓冲液溶解。用凝胶电泳仪（JUNYI，北京）和微量分光光度计（BioSpec-nano，日本）检测 DNA 质量，－20℃储存备用。

1.4 靶基因片段克隆

采用外膜蛋白基因（outer surface protein gene, *wsp*）、二磷酸果糖醛缩酶基因（fructose-bisphosphate aldolase gene, *fbpA*）和酰胺转移酶基因[glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B gene, *gatB*]基因片段的特异引物（Baldo *et al.*, 2006）对上述食胚赤眼蜂样本进行 PCR 扩增（BIO-RAD，美国）。PCR 引物序列见表 1。

PCR 扩增体系为 25 μL：10 × buffer 2.5 μL，2.5 mmol/L dNTPs 1 μL，10 μmol/L 上下游引物各 1 μL，2.0 U/L Quick Taq DNA HS DyeMix 0.5 μL（TOYOBO），DNA 模板 1 μL，用 18 μL ddH_2O 补足至 25 μL。

PCR 扩增条件：95℃预变性 3 min；95℃变性 30 s，52～53℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，30 个循环；72℃终延伸 10 min。

用 1.2% 的琼脂糖凝胶进行电泳，回收、纯化目标片段，然后连接 T 载体（pGM-T Vector）（TIANGEN，北京），热击转化 DH5（感受态，涂布于 X-Gal/ IPTG 的 LB 琼脂糖平板上（含 100 μg/mL Carb.），37℃倒置培养 16 h。每个处理筛选 3～5 个单菌落，经 PCR 验证后扩大培养，用 TIANprep Mini Plasmid Kit（TIANGEN，北京）提取质粒，由北京三博远志基因技术有限公司进行双向测序。

1.5 实时 PCR 定量分析

采用 SYBR Green 荧光染料法，利用 BIO-RAD CFX96™实时荧光定量 PCR 仪（BIO-RAD，美国）进行绝对定量（absolute quantitative PCR, AQ-PCR）检测，通过共生菌 *wsp*，*gatB* 与 *fbpA* 3 个基因对不同温度下培养不同世代的食胚赤眼蜂体内 *Wolbachia* 进行定量分析。每代取样 3 次，每个样品检测 3 次，结果取 9 次的平均值，得到 *wsp*，*gatB* 与 *fbpA* 基因组 DNA 在不同温度和世代下的食胚赤眼蜂体内的绝对拷贝数。

将 *wsp*，*gatB* 与 *fbpA* 三者重组质粒用微量核酸测定仪（BioSpec-nano，日本）进行浓度和纯度测定，按李丽等（2011）方法计算质粒拷贝数，然后用 ddH_2O 进行 10 倍梯度稀释，用作 AQ-PCR 的标准品。选取 $1\times10^{10}\sim1\times10^{3}$ copies/μL 的 8 个浓度梯度作为模板，使用实时荧光定量 PCR 仪 CFX96（BIO-RAD，美国）进行 AQ-PCR 反应，每个模板重复 3 次，根据荧光值的变化规律，系统将自动生成相对应的标准曲线和溶解曲线。

AQ-PCR 反应体系为 25 μL：模板 1 μL，AQ-PCR 上、下游引物（表 1）（5 μmol/L）各 0.5 μL，2 × SuperReal PreMix Plus (with SYBR Green I)（TIANGEN，北京）12.5 μL，ddH_2O 10.5 μL 补足。

AQ-PCR 反应程序：95℃预变性 15 min；95℃变性 10 s，52℃（53℃）退火 20 s，72℃延伸 30 s，经过 39 个循环，接下来生成溶解曲线，65℃ 5 s，每 5 s 升温 0.5℃，直至到达 95℃。反应完成后，得出每个拷贝数所对应的 Ct 值。

AQ-PCR 结果用 Bio-Rad CFX Manager 软件进行数据结果分析、标准曲线绘制和融解曲线分析。

1.6 数据统计与分析

统计食胚赤眼蜂的寄生数、羽化数、雌蜂数、雄蜂数等参数。使用 Microsoft Excel 2007 对数据进行整理，采用 SPSS 软件（version 22.0 for Windows）进行单因素方差分析，Duncan 氏检验方法进行多重比较和差异显著性分析（$P < 0.05$），表和图中的数据均为平均值。

2 结果

2.1 不同温度下食胚赤眼蜂的生物学特性

在不同温度下统计了食胚赤眼蜂的生物学特性，

表 1　本实验所用引物序列信息

Table 1　Primer sequences of *Wolbachia* used in the PCR and AQ-PCR

基因 Gene	产物 Product	引物序列(5′-3′) Primer sequence	退火温度(℃) Annealing temperature	产物大小(bp) Product size
*gat*B	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B	GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT TGGYAAYTC RGG YAA AGATGA	52	445
*fbp*A	Fructose-bisphosphate aldolase	GCTGCTCCRCTTGGYWTGAT CCRCCAGAR AAA AYYACTATTC	52	503
wsp	Outer surface protein	GTCCAATARSTGATGARGAAAC CYGCACCAAYAGYRC TRTAAA	53	528

用寄生数、羽化率和雄蜂百分率来表示。结果见表 2，由表 2 可知，25℃培养的食胚赤眼蜂的寄生数（F_3～F_5代除外）和羽化率较 22℃培养时明显高，两温度下 5 代食胚赤眼蜂供试各项生物学指标均较稳定，在同一温度不同世代之间差异不显著。28℃培养食胚赤眼蜂的寄生数（F_5 代除外）与 25℃时的寄生数没有明显差异，而 28℃培养食胚赤眼蜂的羽化率明显低于 25℃时的羽化率，且各世代间差异 均明显；28℃下食胚赤眼蜂在 F_3 代才开始有雄蜂出现，至 F_5 代雄蜂比例增多至 36.88%。明显比 25℃下的食胚赤眼蜂增多。在 31℃恒温条件下连续培养，食胚赤眼蜂的寄生数和羽化率较其他处理均显著降低，且随世代数的增加而大幅下降，各世代之间差异显著；F_2 代即有雄蜂出现，后代雌性比例大幅降低，F_4 代雌蜂率仅为 17.57%，至 F_5 代已无雌性后代出现，由孤雌产雌生殖恢复成孤雌产雄生殖，各处理间差异显著（表 2）。

表 2　不同温度处理下食胚赤眼蜂的生物学特性

Table 2　Biological characteristics of *Trichogramma embryophagum* at different temperatures

世代 Generation	寄生的卵数 Number of parasitic eggs				羽化率 Emergence rate (%)			
	22℃	25℃	28℃	31℃	22℃	25℃	28℃	31℃
F_1	89.40 ± 0.83 b(a)	93.50 ± 1.17 a(a)	90.80 ± 0.77 ab(a)	85.30 ± 1.02 c(a)	85.69 ± 0.68 c(a)	94.98 ± 0.32 a(a)	92.06 ± 1.70 b(a)	79.50 ± 1.96 d(a)
F_2	86.50 ± 1.02 b(a)	90.70 ± 1.11 a(a)	88.50 ± 1.08 ab(ab)	80.50 ± 1.77 c(b)	85.07 ± 0.62 c(a)	95.05 ± 0.55 a(a)	90.66 ± 0.65 b(b)	74.27 ± 1.47 d(b)
F_3	87.10 ± 1.20 a(a)	89.80 ± 1.34 a(a)	87.30 ± 0.82 a(b)	75.40 ± 1.84 b(c)	85.05 ± 0.62 c(a)	94.76 ± 0.44 a(a)	90.61 ± 0.50 b(b)	67.62 ± 1.12 d(c)
F_4	87.00 ± 0.84 a(a)	89.70 ± 1.37 a(a)	87.10 ± 0.91 a(b)	51.60 ± 1.51 b(d)	85.61 ± 0.62 c(a)	95.07 ± 0.47 a(a)	90.25 ± 0.87 b(b)	38.46 ± 1.16 d(d)
F_5	87.20 ± 1.46 ab(a)	90.40 ± 1.12 a(a)	85.60 ± 1.12 b(b)	17.40 ± 0.76 c(e)	86.00 ± 0.56 c(a)	94.12 ± 0.89 a(a)	90.64 ± 0.49 b(b)	13.03 ± 0.90 d(e)

世代 Generation	雄蜂百分率 Percentage of males			
	22℃	25℃	28℃	31℃
F_1	0.00 ± 0.00 a(a)	0.00 ± 0.00 a(a)	0.00 ± 0.00 a(d)	0.00 ± 0.00 a(e)
F_2	0.00 ± 0.00 b(a)	0.00 ± 0.00 b(a)	0.00 ± 0.00 b(d)	17.56 ± 1.09 a(d)
F_3	0.00 ± 0.00 c(a)	0.00 ± 0.00 c(a)	8.35 ± 0.43 b(c)	46.31 ± 0.66 a(c)
F_4	0.00 ± 0.00 c(a)	0.00 ± 0.00 c(a)	16.37 ± 0.88 b(b)	82.11 ± 1.21 a(b)
F_5	0.00 ± 0.00 c(a)	0.00 ± 0.00 c(a)	36.88 ± 0.66 b(a)	100.00 ± 0.00 a(a)

表中数据为平均值±标准误；同行数据后括号外不同字母表示同一指标在同一世代不同温度间在 0.05 水平上差异显著（DMRT 法）；同列数据后括号内不同字母表示同一温度下不同世代间在 0.05 水平上差异显著（DMRT 法）；表 4 同。Data in the table are mean ± *SE*, different letters outside parentheses following the data in a row indicate significant difference at the 5% level in the same index of the same generation between different temperatures (DMRT), while different letters in parentheses following the data in a column indicate significant difference at the 5% level between different generations at the same temperature (DMRT). The same for Table 4.

从表 3 可知，食胚赤眼蜂单头雌蜂的寄生卵粒数、羽化率和雌雄性后代比例在不同温度处理下都存在显著差异($P<0.05$)，而在不同世代之间并未有显著差异，温度和世代对食胚赤眼蜂的生殖力和雌雄性后代比例存在显著的交互作用(表 3)。

表 3 食胚赤眼蜂的寄生数、羽化率及后代性别的两因素方差分析

Table 3 Factorial ANOVA of the fecundity, emergence rate and sex ratio of *Trichogramma embryophagum* in the temperature test

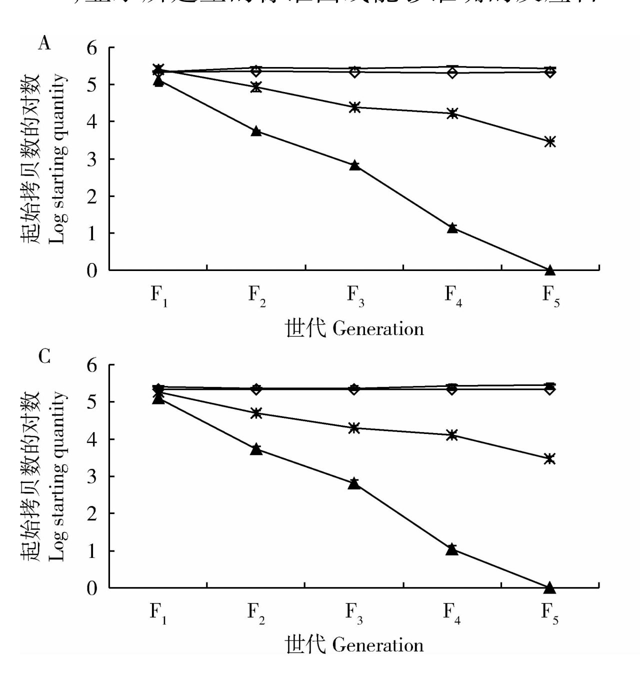
变异来源 Source of variation	*df*	寄生的卵数(粒) Number of parasitic eggs		羽化率(%) Emergence rate		雄蜂百分比 Percentage of males	
		F	*P*	*F*	*P*	*F*	*P*
温度 Temperature	3	4.836	0.020	8.535	0.003	6.740	0.006
世代 Generation	4	1.287	0.329	1.036	0.428	2.000	0.159
温度 * 世代 Temperature * generation	12	130.712	0	327.617	0	1 759.504	0

2.2 温度对食胚赤眼蜂体内 *Wolbachia* 滴度的影响

2.2.1 标准曲线的建立和回归方程的设定：以已知浓度 DNA 为模板进行 PCR 扩增，以基因模板数的对数 logSQ(起始拷贝数的对数值，log starting quantity)为横坐标，Ct(cycle threshold，为到达阈值时所经过的扩增循环次数)值为纵坐标建立坐标系，分别得到 *wsp*，*gatB* 和 *fbpA* 3 个基因的标准曲线。线性回归方程分别是：$Y=-4.0861X+46.606$，$Y=-4.0866X+46.85$ 和 $Y=-4.0718X+46.705$，曲线的相关系数 R^2 分别为 0.996，0.993 和 1，说明在质粒稀释浓度范围内具有良好的线性关系。曲线的扩增效率 *E* 分别为 96.7%，98.3% 和 97.1%，显示所建立的标准曲线能够准确的反应目的产物的扩增。其中，溶解曲线均表现为单一的峰，表明引物具有很好的特异性，产物的 Tm 值均一(83.0～83.5℃)，表明扩增效率一致。

2.2.2 不同继代间食胚赤眼蜂体内 *Wolbachia* 滴度的变化：对恒温(22，25，28 和 31℃)培养的不同继代雌成虫样本体内的 *wsp*，*gatB* 与 *fbpA* 基因进行 AQ-PCR 扩增，得出每个样品 Ct 值，然后根据所对应基因的标准曲线转换成 logSQ。以继代培养数为 *X* 轴，以 logSQ 为 *Y* 轴建立坐标系，得到 *Wolbachia* 在不同继代间的定量动态变化趋势。

从图 1 可知，在 22 和 25℃时，食胚赤眼蜂体内 *wsp* 基因的含量很稳定，随着代数的增加并没有明显的变化；而在 28 和 31℃时，*wsp* 基因的含量随着



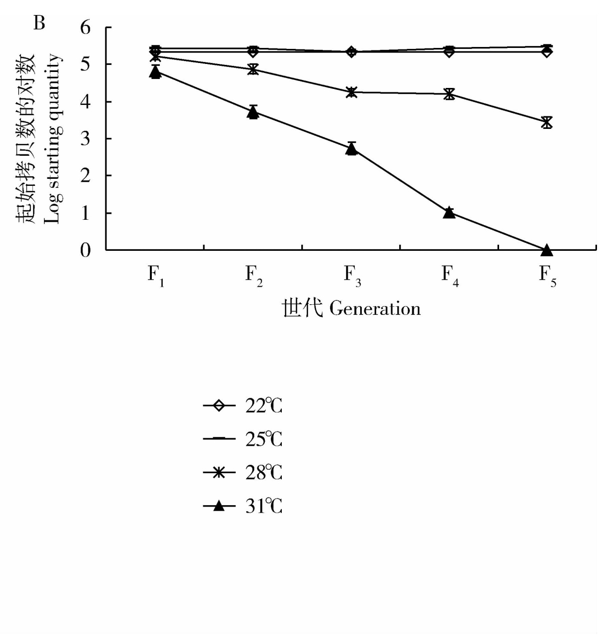


图 1 AQ-PCR 检测 *Wolbachia* 滴度在食胚赤眼蜂不同继代间的动态变化

Fig. 1 Dynamic changes in *Wolbachia* titer between different generations of *Trichogramma embryophagum* detected by AQ-PCR

A：*wsp*；B：*gatB*；C：*fbpA*.

代数的增加显著下降。28℃时，*wsp* 基因的表达量在 F_2 代开始有下降趋势，在 F_5 代开始有较明显的下降；31℃下在 F_2 代即呈显著下降，到 F_5 代已检测不到。由此可知，在 22 和 25℃时，食胚赤眼蜂体内 *Wolbachia* 的滴度较稳定，在 28 和 31℃时，随着培养继代数的增加，食胚赤眼蜂体内 *Wolbachia* 的滴度呈下降趋势，且随着培养温度的升高以及培养时间的延长，其下降的趋势越显著。

以上每个样本均分别进行 3 次生物学重复，3 次技术重复。在各个样本中，*wsp*，*gatB* 与 *fbpA* 3 个基因的含量没有明显差别，且具有相同的变化趋势。说明该实验重复性较好，其结果的可信度较高。

2.2.3 食胚赤眼蜂体内 *Wolbachia* 滴度与温度的相关性：以各处理样本体内 *wsp* 基因的起始拷贝数的对数 logSQ 为横坐标，以各代雄蜂百分率为纵坐标建立坐标系，获得两者之间的量化关系（表 4）：随着温度的升高，宿主雄蜂百分率与宿主体内 *Wolbachia* 滴度呈正相关，且随着处理代数的增加，其相关性越大。

表 4 *Wolbachia* 滴度与食胚赤眼蜂雄蜂百分率及温度的相关性

Table 4 Correlation between *Wolbachia* titer and percentage of males of *Trichogramma embryophagum* or temperature

世代 Generation	*Wolbachia* 滴度 *Wolbachia* titer					
	22℃	25℃	28℃	31℃		
F_1	5.335 ±0.009 a(a)	5.397 ±0.472 a(a)	5.306 ±0.938 a(a)	5.015 ±0.176 b(a)		
F_2	5.344 ±0.013 a(a)	5.414 ±0.045 a(a)	4.833 ±0.116 b(b)	3.738 ±0.017 c(b)		
F_3	5.341 ±0.006 a(a)	5.375 ±0.041 a(a)	4.319 ±0.068 b(c)	2.788 ±0.045 c(c)		
F_4	5.328 ±0.007 b(a)	5.448 ±0.030 a(a)	4.182 ±0.066 c(c)	1.068 ±0.070 d(d)		
F_5	5.337 ±0.010 b(a)	5.451 ±0.027 a(a)	3.458 ±0.018 c(d)	0.000 ±0.000 d(e)		
世代 Generation	雄蜂百分率 Percentage of males				r^2	R^2
	22℃	25℃	28℃	31℃		
F_1	0.00 ±0.00 a(a)	0.00 ±0.00 a(a)	0.00 ±0.00 a(d)	0.00 ±0.00 a(e)	–	$R_1^2=0.6386$
F_2	0.00 ±0.00 b(a)	0.00 ±0.00 b(a)	0.00 ±0.00 b(d)	17.56 ±1.09 a(d)	$r_2^2=0.8881$	$R_2^2=0.8107$
F_3	0.00 ±0.00 c(a)	0.00 ±0.00 c(a)	8.35 ±0.43 b(c)	46.31 ±0.66 a(c)	$r_3^2=0.9452$	$R_3^2=0.8575$
F_4	0.00 ±0.00 c(a)	0.00 ±0.00 c(a)	16.37 ±0.88 b(b)	82.11 ±1.21 a(b)	$r_4^2=0.9932$	$R_4^2=0.9440$
F_5	0.00 ±0.00 c(a)	0.00 ±0.00 c(a)	36.88 ±0.66 b(a)	100.00 ±0.00 a(a)	$r_5^2=0.9995$	$R_5^2=0.9765$

r^2：食胚赤眼蜂雄蜂百分率与其体内 *Wolbachia* 滴度的相关性 Correlation between percentage of males and *Wolbachia* titer in *T. embryophagum*；R^2：食胚赤眼蜂体内 *Wolbachia* 滴度与温度的相关性 Correlation between *Wolbachia* titer in *T. embryophagum* and temperature.

以培养温度为横坐标，以各代雄蜂样本体内 *wsp* 基因的起始拷贝数的对数 logSQ 为纵坐标建立坐标系，进行 *Wolbachia* 滴度与温度间的连续相关分析。由表 4 可知，在温度不低于 25℃时，宿主体内的 *Wolbachia* 滴度与温度呈负相关，并且，随着处理代数的增加，温度越高，其相关线性关系越好。

3 讨论

本研究结果表明，在温度高于 25℃恒温培养时，随着饲养代数的增加，子代逐渐有雄蜂出现（恢复产两性生殖），而且温度越高，出现雄蜂的代数越早；在温度 25℃或以下时，随着代数的增加，食胚赤眼蜂呈孤雌生殖的生殖方式并未发生改变，子代也未发现雄蜂。这种生殖方式的变化趋势与张海燕等（2009）在温度对感染 *Wolbachia* 的松毛虫赤眼蜂生殖稳定性中赤眼蜂的变化趋势相同 。

通过绝对定量方法对不同温度和继代处理下，食胚赤眼蜂体内内共生菌 *Wolbachia* 的滴度绝对拷贝数进行测定，发现温度高于 25℃时，随着继代培养数的增加，食胚赤眼蜂体内 *Wolbachia* 的滴度呈下降趋势，温度越高，下降趋势明显加快；在温度不高于 25℃时，内共生菌 *Wolbachia* 的滴度在食胚赤眼蜂体内较稳定，未有明显的变化，表明食胚赤眼蜂体内 *Wolbachia* 的量的变化与食胚赤眼蜂的生殖特性的变化趋势是一致的。结果表明，高温可改变营孤雌生殖赤眼蜂的生殖方式及其体内 *Wolbachia* 含量，且随着温度的升高以及处理时间的延长作用显著，即高温对营孤雌生殖赤眼蜂生殖方式改变程度与其体内 *Wolbachia* 含量负相关，而 *Wolbachia* 含量与宿主生殖方式和强度正相关。另外，在 28℃时，食胚赤眼蜂雌蜂率在 F_2 代略有下降，但在 F_3 代才开始有雄蜂出现，而其体内 *Wolbachia* 含量也是在 F_2 代即有所下降。这种现象也曾在 Bordenstein 和 Bordenstein（2011）文中出现：只有 *Wolbachia* 滴度达到一定阈值，温度才能调控寄生蜂 CI 生殖方式。可见温度对 PI 食胚赤眼蜂的影响与其对 CI 寄生蜂的影响类似。

另外，Bordenstein 等(2006)在研究中发现 CI 强度与 *Wolbachia* 滴度正相关，与噬菌体滴度负相关，*Wolbachia* 滴度与噬菌体滴度负相关。Bordenstein 和 Bordenstein(2011)在温度对模式寄生蜂 *Nasonia vitripennis* 影响的研究指出低温(18℃)和高温(30℃)显著影响 *Wolbachia* 和噬菌体 WO 的滴度，都导致了 *Wolbachia* 滴度的降低，即温度同时影响噬菌体 WO 滴度，共生菌滴度和 CI 外显性。因此噬菌体 WO 亦可能是导致 *Wolbachia* 滴度变化和 PI 赤眼蜂生殖方式改变的原因，但其具体相关性及调控机制还有待进一步研究验证。

长期以来，温度对 *Wolbachia* 影响的研究主要集中在 PI 宿主的生物学特性和 CI 宿主上。其导致 *Wolbachia* 的去除和 PI 赤眼蜂生殖方式改变现象的具体原因仍不清楚。该研究通过绝对定量方法定量分析感染态食胚赤眼蜂生物学特性与其体内 *Wolbachia* 滴度的相关性，明确了温度对宿主昆虫体 *Wolbachia* 滴度的影响，阐述了温度介导的 *Wolbachia* 调控 PI 赤眼蜂生殖的现象，丰富了共生菌 *Wolbachia* 对宿主生殖调控的理论，为进一步分析 *Wolbachia* 调控宿主 PI 生殖的分子机制奠定了基础。

参考文献(References)

Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MCJ, Tettelin H, Werren JH, 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(11): 7098-7110.

Bordenstein SR, Bordenstein SR, 2011. Temperature affects the tripartite interactions between bacteriophage WO, *Wolbachia*, and cytoplasmic incompatibility. *PLoS ONE*, 6(12): e29106.

Bordenstein SR, Marshall ML, Fry AJ, Kim U, Wernegreen JJ, 2006. The tripartite associations between bacteriophage, *Wolbachia*, and arthropods. *PLoS Pathog.*, 2(5): e43.

Cong B, Stouamer R, Schilthamer M, 1998. Parthenogenesis of wasps and *Wolbachia*. In: Cheng DF ed. Prospects of Plant Protection in 21st Century. Chinese Science and Technology Press, Beijing. 665-669. [丛斌, Stouamer R, Schilthamer M, 1998. *Wolbachia* 与寄生蜂的孤雌生殖. 见: 程登发 主编. 植物保护 21 世纪展望. 北京: 中国科学技术出版社. 665-669]

Cordaux R, Bouchon D, Grève P, 2011. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Cell*, 27(8): 332-341.

Fleury F, Allemand R, Fouillet P, Boulétreau M, 1995. Genetic variation in locomotor activity rhythm among populations of *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera: Eucoilidae), a larval parasitoid of *Drosophila* species. *Behav. Genet.*, 25(1): 81-89.

Fleury F, Vavre F, Ris N, Fouillet P, Boulétreau M, 2000. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Parasitol.*, 121(5): 493-500.

Huigens ME, Luck RF, Klaassen RHG, Maas MFPM, Timmermans MJTN, Stouthamer R, 2000. Infectious parthenogenesis. *Nature*, 405(6783): 178-179.

Jaenike J, Dyer KA, 2008. No resistance to male-killing *Wolbachia* after thousands of years of infection. *J. Evol. Biol.*, 21(6): 1570-1577.

Jiggins FM, Hurst GDD, Jiqqins CD, Schulenburg JHVD, Majerus MEN. 2000. The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male killing *Spiroplasma* bacterium. *Parasitology*, 120(5): 439-446.

Kondo N, Shimada M, Fukatsu T, 2005. Infection density of *Wolbachia* endosymbiont affected by co-infection and host genotype. *Biol. Lett.*, 1(4): 488-491.

Li L, Zhao CP, Li H, Li WF, Zhang LH, Xu DM, Wang JS, Li HF, 2011. Establishment of the plasmid standard curve generation method for absolute quantification PCR. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 19(6): 1157-1162. [李丽, 赵成萍, 李宏, 李武峰, 张利环, 许冬梅, 王金胜, 李慧锋, 2011. 质粒制备绝对定量 PCR 标准曲线方法的建立. 农业生物技术学报, 19(6): 1157-1162]

Li ZX, Shen ZR, 2001. rDNA-ITS2 sequencing and species-specific primer designing for *Trichogramma*. *Chinese J. Biol. Contr.*, 17(2): 75-80. [李正西, 沈佐锐, 2001. 赤眼蜂 rDNA-ITS2 克隆测序及蜂种特异引物设计. 中国生物防治, 17(2): 75-80]

Liu XL, Dong H, Cong B, Zhang ZT, Gang S, 2011. DNA extraction of single-head *Trichogramma* and PCR system optimization. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 42(2): 170-174. [柳晓丽, 董辉, 丛斌, 张柱亭, 江爽, 2011. 单头赤眼蜂 DNA 提取方法比较及其 PCR 反应体系优化. 沈阳农业大学学报, 42(2): 170-174]

Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M, 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 250(1328): 91-98.

Schilthuizen M, Stouthamer R, 1997. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 264(1380): 361-366.

Stouthamer R, Luck RF, Hamilton WD, 1990. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(7): 2424-2427.

Weeks AR, Breeuwer JAJ, 2001. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268(1482): 2245-2251.

Zabalou S, Riegler M, Theodorakopoulou M, Stauffer C, Savakis C, Bourtzis K, 2004. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(42): 15042-15045.

Zhang HY, Cong B, Tian Q, Fu HB, Dong H, 2006. Effect of temperature on the population parameters of *Trichogramma dendrolimi* infected by *Wolbachia*. *Acta Entomologica Sinica*, 49

(3)：433 –437. [张海燕，丛斌，田秋，付海滨，董辉，2006. 温度对感染沃尔巴克氏体的松毛虫赤眼蜂种群参数的影响. 昆虫学报，49(3)：433 –437]

Zhang HY，Zhang Y，Cong B，Qian HT，Dong H，Fu HB，2009. Effects of environmental factors on stability of thelytoky of *Trichogramma dendrolimi* infected with *Wolbachia*. *Scientia Agriculture Sinica*，42(7)：2366 –2372. [张海燕，张莹，丛斌，钱海涛，董辉，付海滨，2009. 外界生态因子对感染 *Wolbachia* 的松毛虫赤眼蜂生殖稳定性影响. 中国农业科学，42(7)：2366 – 2372]

（责任编辑：赵利辉）